

氏 名	倉田 竜明
所 属	理工学研究科 生命科学専攻
学 位 の 種 類	博士（理学）
学 位 記 番 号	理工博 第 196 号
学位授与の日付	平成 28 年 3 月 25 日
課程・論文の別	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題名	16S rRNA のプロセシングに関与する大腸菌必須遺伝子 <i>yqgF</i> の解析 (英文)
論文審査委員	主査 教 授 加藤 潤一 委員 准教授 春田 伸 委員 准教授 高鳥 直士

【論文の内容の要旨】

本文

大腸菌では約 4,400 個の全遺伝子の中で、生育に必要な全遺伝子約 300 個が同定されている。その必須遺伝子の中で機能のわかっていなかった遺伝子 *yqgF* についての解析が先行研究で進められ、まず高温感受性変異株 (*yqgF^{ts}* 株) が単離された。またその変異株を非許容温度で培養した時にリボソーム RNA (rRNA) の 16S rRNA の前駆体 (pre-16S rRNA) が蓄積することがわかり、YqgF タンパク質 (YqgF) は rRNA のプロセシングに関与することが明らかになった。大腸菌の rRNA (16S, 23S, 5S) は一つの rRNA 前駆体からプロセシングされることによって作られるが、*yqgF^{ts}* 株で蓄積した pre-16S rRNA については 16S rRNA の 5' 末端側がプロセシングされていないものが同定され、YqgF は 16S rRNA の 5' 末端側のプロセシングに関与する事が明らかになった。また *yqgF^{ts}* 株から精製した pre-16S rRNA を含むリボソームを基質にした時に、精製した YqgF によるプロセシングが *in vitro* で確認され、YqgF は 16S rRNA の 5' 末端側のプロセシングに直接関与する事が明らかになった。本研究ではこれらの先行研究を基に、YqgF の生化学的、生物学的機能を詳細に解明することを目的とした。

先行研究では YqgF の 16S rRNA の 5' 末端側のプロセシングへの関与が RACE 法により半定量的には示されていたが、プロセシングの位置とプロセシングによってできる RNA 断片の量が正確にはわかっていなかった。そこで本研究では primer extension 法により定量的な解析を行った。その結果、*yqgF^{ts}* 株で蓄積した pre-16S rRNA の 5' 末端は mature end か

ら 115 塩基上流の末端であることがわかった。さらに精製したリボソームに含まれる pre-16S rRNA を基質にした時に、精製 YqgF によって *in vitro* でプロセッシングされた 16S rRNA の 5' 末端の大部分が mature end であることもわかった。これらの結果から、YqgF は pre-16S rRNA の 5' 末端側のほぼ 16S rRNA の末端にあたる部分をプロセッシングすることが明らかになった。

16S rRNA の 5' 側のプロセッシングについては、3 種の RNase (RNase III, RNase G, RNase E) によって段階的にプロセッシングされることがこれまでに報告されている。そこで生育に必須な RNase E を除く RNase III, RNase G と YqgF との関係について調べた。まず RNase G や RNase III の欠損は *yqgF^{ts}* 株の生育に影響しないことがわかった。また 16S rRNA のプロセッシングについても同様に、YqgF による 16S rRNA のプロセッシングについて、RNase G や RNase III の欠損による顕著な影響は見られないことがわかった。これらの結果から、YqgF によるプロセッシングは RNase G や RNase III には依存しないことが明らかになった。

このような *in vitro* の解析から YqgF が RNase であることが示唆されたが、精製したリボソームに含まれる pre-16S rRNA を基質にした時にはプロセッシングが見られたのに対して、精製した pre-16S rRNA を基質にした時にはプロセッシングが見られず、YqgF が RNase であることが明確ではなかった。しかし、YqgF は大腸菌の RNase HI と立体構造が類似していることから、YqgF が RNase である可能性が考えられたので、*in vitro* で YqgF が精製した pre-16S rRNA をプロセッシングする条件について調べた。その結果、Mn²⁺イオン存在下で精製した YqgF に RNase 活性が同定された。さらに pull-down assay により YqgF とリボソームの相互作用についても直接確認することができた。これらの結果から、YqgF がリボソームを基質とする RNase であることが明らかになった。

YqgF が 16S rRNA のプロセッシングに関与することがわかったので、YqgF の翻訳における機能を調べるため、*yqgF^{ts}* 株のプロテオーム解析を行った。その結果、コード領域中に SD 様配列を多く持つ遺伝子から作られるタンパク質の量が少ない傾向にあることを見出した。また先行研究により、SD 配列との相互作用を介して翻訳を行う場合のリボソームにおいて必須な働きをする、S1 サブユニットの量が *yqgF^{ts}* 株では減少していることが示唆されていたので、*yqgF^{ts}* 株のリボソームについてプロテオーム解析を行った。その結果、*yqgF^{ts}* 株のリボソームでは S1 サブユニットが特異的に減少していることが明らかになった。

また人工的に pre-16S rRNA の 5' 末端側領域を欠失した株を作製して調べたところ、その株の生育が低温感受性になる事がわかり、YqgF によってプロセッシングされる領域は低温条件下におけるリボソーム形成に関与する可能性が考えられた。実際にこの株のリボソームを解析した結果、50S と 30S に分かれた不活性型リボソームが蓄積し、その 30S リボソームの 16S rRNA は異常にプロセッシングされていることがわかった。この結果から、pre-16S rRNA の 5' 末端側領域はリボソーム形成時にリボソームの不活化につながる異常なプロセッシングを防ぐ役割をしている可能性が考えられた。

以上の結果から YqgF は pre-16S rRNA の 5' 末端側の主要なプロセッシングを担う RNase で

あり、リボソーム形成時に pre-16S rRNA の 5' 末端側を mature end までプロセッシングすることが明らかになった。またプロセッシングされる pre-16S rRNA の 5' 末端側は低温条件下でのリボソーム形成に重要な働きをすると同時に、翻訳活性に必要な S1 サブユニットのリボソームへ結合を阻害することが考えられた。これらの結果からは、形成中は不活性型として存在するリボソームを、形成後に pre-16S rRNA の 5' 末端側をプロセッシングすることにより S1 サブユニットが結合可能な活性型リボソームに変換するスイッチとして YqgF が機能している可能性が考えられる。